



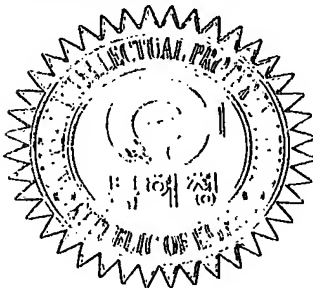
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0084492
Application Number

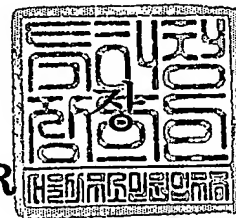
출원 년 월 일 : 2003년 11월 26일
Date of Application NOV 26, 2003

출원인 : 에스케이 주식회사
Applicant(s) SK CORPORATION



2004 년 10 월 29 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004. 10. 25
【제출인】	
【명칭】	에스케이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-002981-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【명칭】	청운특허법인
【대리인코드】	9-2002-100001-8
【지정된변리사】	이철 , 이인실, 최재승, 신한철
【포괄위임등록번호】	2002-065078-9
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0084492
【출원일자】	2003. 11. 26
【발명의 명칭】	가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메 틸 에스테르 화합물의 제조방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2003-0448167-96
【접수일자】	2003. 11. 26
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음
【보정방법】	별지와 같음
【보정내용】	별지와 같음
【추가청구항수】	14
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규 정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 청운특허법인 (인)



1020030084492

출력 일자: 2004/11/1

【수수료】

【보정료】 3,000 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 3,000 원

【보정대상항목】 요약

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물의 제조방법에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로, 사비나제(Savinase), 알칼라제(Alcalase), 노보짐 243(Novozym 243), 에버라제(Everlase), 에스퍼라제(Esperlase), 프로테아제 7(Protease 7) 및 아실라제(Acylase)로 이루어진 군으로 부터 선택된 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 제조방법은, 광학순도 및 수율이 우수하면서도 저렴한 산업용 효소를 사용하기 때문에 제조공정을 단순화시키면서도 광학순도 99%e.e 이상의 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 그의 메틸 에스테르를 제공할 수 있으며, 기존에 개발된 공정에 비해 경제적으로 큰 효율을 보이므로 산업상 매우 유용하여 실제적인 접근이 가능한 장점이 있다.

【보정대상항목】 식별번호 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 {(S)-Indoline-2-carboxylic acid} 및 이의 메틸 에스테르(methyl ester) 화합물의 제조방법에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로 산업적으로 이용가능한 미생물 유래 가수

분해 효소를 사용하여 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르로부터 광학순도 99%e.e. 이상의 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

【보정대상항목】 식별번호 2

【보정방법】 정정

【보정내용】

(S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물은 자체적으로도 실험 및 임상단계에 있는 많은 신약의 중간체로 사용될 뿐 아니라 수소화를 통해 (2S)-(2,3a β ,7a β)-옥타히드로인돌-2-카르복실산{(2S)-(2 α ,3a β ,7a β)-Octahydroindole-2-carboxylic acid}으로 전환할 경우 현재 서비어(Servier)사(프랑스)에서 판매중인 페린도프릴™ (Perindopril™)과 같은 고혈압 치료제의 중간체로 사용할 수 있기 때문에, 많은 연구가 진행되어 왔다.

【보정대상항목】 식별번호 6

【보정방법】 정정

【보정내용】

두 번째로 키랄 보조체를 이용한 비대칭 수소화는 기질과 키랄형의 리간드를 갖는 금속촉매를 용매에 첨가한 뒤 기질을 광학 선택적으로 수소화하는 것이다. 구와노(Kuwano) 등은 탄산세슘이 들어있는 이소프로판올 용액하에서 촉매로서

[Rh(norbornadiene)₂]⁺SbF₆⁻, 리간드로서

Bis(diphenylphosphinoethyl)-biferrocene(S,S)-(R,R)-PhTRAP와 함께, 60℃, 5.0MPa의

조건으로 아세틸화된 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 수소화하여 95%e.e.의 광학순도를 갖는 아세틸화된 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 95%의 수율로 획득하였다(Kuwano R. et al., JACS, 122(31), 7614, 2000). 이 공정은 생성물의 수율이 높은 반면 광학순도가 낮은 단점이 있고, 수소화에 사용되는 키랄 보조제가 매우 고가이며 합성이 간단하지 않을 뿐 아니라 고가의 장비 및 시설이 필요함에 따라 실제 공정에 적용하기에는 어려움이 많다.

【보정대상항목】 식별번호 16

【보정방법】 정정

【보정내용】

이에 상술한 문제를 해결하기 위하여 연구를 수행한 결과, 저 분자량의 메틸 알코올과 라세믹 인돌린-2-카르복실산을 이용하여 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 제조하고 산업용 가수분해 효소를 사용하여 광학분할시켜 높은 광학순도의 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 에스테르 화합물을 얻을 수 있었으며, 본 발명은 이를 기초로 완성되었다.

【보정대상항목】 식별번호 17

【보정방법】 정정

【보정내용】

따라서, 본 발명의 목적은 제조공정이 간단하며 경제적으로 효율이 높은 가수분해 효소를 이용하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 제조방법을 제공하는 데 있다.

【보정대상항목】 식별번호 18

【보정방법】 정정

【보정내용】

상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 제조방법은 라세믹 인돌린-2-카르복실산과 메탄올 및 염화 티오닐을 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 얻는 단계; 완충용액 하에서 가수분해 효소를 사용하여 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 R-폼을 선택적으로 가수분해시켜 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 생성시키는 단계; 및 상기 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 분리하고 회수하는 단계를 포함하며, 상기 가수분해 효소는 사비나제(Savinase), 알카라제(Alcalase), 노보짐 243(Novozym 243), 에버라제(Everlase), 에스퍼라제(Espersase), 프로테아제 7(Protease 7) 및 아실라제(Acylase)로 이루어진 군으로 부터 선택된다. 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산의 제조방법은 라세믹 인돌린-2-카르복실산과 메탄올 및 염화 티오닐을 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 얻는 단계; 완충용액하에서 가수분해 효소를 사용하여 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 R-폼을 선택적으로 가수분해시켜 비가수분해 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 얻는 단계; 상기 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 분리하고 회수하는 단계; 및 상기 회수된 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 알칼리 수용액하에서 가수분해하여 (S)-인돌린-2-카르복실산을 생성시키고 상기 수득된 (S)-인돌린-2-카르복실산을 회수하는 단계를 포함하며, 상기 가수분해 효소는 사비나제(Savinase), 알카라제(Alcalase), 노보짐

243(Novozym 243), 에버라제(Everlase), 에스퍼라제(Esperlase), 프로테아제 7(Protease 7) 및 아실라제(Acylase)로 이루어진 군으로 부터 선택된다.

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 2

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 3

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 4

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 5

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 6

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 7

【보정방법】 추가

【보정내용】

라세믹 인돌린-2-카르복실산과 메탄올 및 염화 티오닐을 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 얻는 단계;

완충용액하에서 가수분해 효소를 사용하여 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 R-폼을 선택적으로 가수분해시켜 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 생성시키는 단계; 및

상기 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 분리하고 회수하는 단계를 포함하며,

상기 가수분해 효소는 사비나제(Savinase), 알카라제(Alcalase), 노보짐 243(Novozym 243), 에버라제(Everlase), 에스퍼라제(Espersase), 프로테아제 7(Protease 7) 및 아실라제(Acylase)로 이루어진 군으로 부터 선택되는 것을 특징으로 하는 가수분해 효소를 사용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 제조방법.

【보정대상항목】 청구항 8

【보정방법】 추가

【보정내용】

제7항에 있어서, 상기 완충용액은 탄산나트륨 수용액이며 pH를 7 내지 9로 유지시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 9

【보정방법】 추가

【보정내용】

제7항에 있어서, 상기 선택적으로 가수분해시키는 단계는 25 내지 50℃에서 3 내지 85시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 10

【보정방법】 추가

【보정내용】

제7항에 있어서, 상기 가수분해 효소에 대한 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 비율은 무게비로 1 : 10 내지 1 : 40 인것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 11

【보정방법】 추가

【보정내용】

제7항에 있어서, 상기 선택적으로 가수분해시키는 단계에서 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 농도는 10 내지 50%(w/w)인 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 12

【보정방법】 추가

【보정내용】

제7항에 있어서, 상기 가수분해 효소는 분말 또는 액상 형태, 또는 담체로 고정화된 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 13

【보정방법】 추가

【보정내용】

제7항에 있어서, 상기 회수된 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르는 적어도 99%e.e의 광학 순도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 14

【보정방법】 추가

【보정내용】

라세믹 인돌린-2-카르복실산과 메탄올 및 염화 티오닐을 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 얻는 단계;

완충용액하에서 가수분해 효소를 사용하여 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 R-폼을 선택적으로 가수분해시켜 비가수분해 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 얻는 단계;

상기 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 분리하고 회수하는 단계; 및

상기 회수된 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 알칼리 수용액하에서 가수분해하여 (S)-인돌린-2-카르복실산을 생성시키고 상기 수득된 (S)-인돌린-2-카르복실산을 회수하는 단계를 포함하며,

상기 가수분해 효소는 사비나제(Savinase), 알카라제(Alcalase), 노보짐 243(Novozym 243), 에버라제(Everlase), 에스퍼라제(Espersase), 프로테아제

7(Protease 7) 및 아실라제(Acylase)로 이루어진 군으로 부터 선택되는 것을 특징으로 하는 가수분해 효소를 사용한 (S)-인돌린-2-카르복실산의 제조방법.

【보정대상항목】 청구항 15

【보정방법】 추가

【보정내용】

제14항에 있어서, 상기 완충용액은 탄산나트륨 수용액이며 pH를 7 내지 9로 유지시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 16

【보정방법】 추가

【보정내용】

제14항에 있어서, 상기 선택적으로 가수분해시키 단계는 25 내지 50℃에서 3 내지 85시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 17

【보정방법】 추가

【보정내용】

제14항에 있어서, 상기 가수분해 효소에 대한 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 비율은 무게비로 1 : 10 내지 1 : 40 인것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 18

【보정방법】 추가

【보정내용】

제14항에 있어서, 상기 선택적으로 가수분해시키는 단계에서 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 농도는 10 내지 50%(w/w)인 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 19

【보정방법】 추가

【보정내용】

제14항에 있어서, 상기 가수분해 효소는 분말 또는 액상 형태, 또는 담체로 고정화된 형태인 것을 특징으로 하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 20

【보정방법】 추가

【보정내용】

제14항에 있어서, 상기 회수된 (S)-인돌린-2-카르복실산은 적어도 99%e.e의 광학 순도를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003. 11. 26
【발명의 명칭】	가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Method of preparing (S)-Indoline-2-carboxylic acid and (S)-Indoline-2-carboxylic acid methyl ester using a hydrolytic enzyme
【출원인】	
【명칭】	에스케이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-002981-1
【대리인】	
【명칭】	청운특허법인
【대리인코드】	9-2002-100001-8
【지정된변리사】	이철 , 이인실, 최재승, 신한철
【포괄위임등록번호】	2002-065078-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조남륜
【성명의 영문표기】	CHO, Nahm Ryune
【주민등록번호】	681218-1459827
【우편번호】	305-252
【주소】	대전광역시 유성구 원내동 208-12
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임종호
【성명의 영문표기】	LIM, Jong Ho
【주민등록번호】	740524-1064020
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 102-502
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

김종근

【성명의 영문표기】

KIM, Jong Keun

【주민등록번호】

631007-1841016

【우편번호】

305-728

【주소】

대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 104-1102

【국적】

KR

【취지】특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
청운특허법인 (인)**【수수료】****【기본출원료】**

20 면 29,000 원

【가산출원료】

1 면 1,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

0 항 0 원

【합계】

30,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물의 제조방법에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로, 라세믹 인돌린-2-카르복실산과 메탄올 및 염화 티오닐을 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물을 얻는 단계; 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물을 가수분해 효소를 사용하여 가수분해 반응시켜 광학분할하는 단계; 및 상기 광학분할된 에스테르 화합물을 알칼리 수용액에서 가수분해 반응시켜 (S)-인돌린-2-카르복실산을 생성시키는 단계를 포함하는 가수분해 효소를 사용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 제조방법은, 광학순도 및 수율이 우수하면서도 저렴한 산업용 효소를 사용하기 때문에 제조공정을 단순화시키면서도 광학순도 99%e.e 이상의 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 그의 메틸 에스테르를 제공할 수 있으며, 기존에 개발된 공정에 비해 경제적으로 큰 효율을 보이므로 산업상 매우 유용하여 실제적인 접근이 가능한 장점이 있다.

【색인어】

가수분해효소, 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르, (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르, (S)-인돌린-2-카르복실산

【명세서】

【발명의 명칭】

가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물의 제조방법{Method of preparing (S)-Indoline-2-carboxylic acid and (S)-Indoline-2-carboxylic acid methyl ester using a hydrolytic enzyme}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산{(S)-Indoline-2-carboxylic acid} 및 이의 메틸 에스테르(methyl ester) 화합물의 제조방법에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로 산업적으로 이용가능한 미생물 유래 가수 분해 효소를 사용하여 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르로부터 광학순도 99%e.e. 이상의 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- <2> (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물은 자체적으로도 실험 및 임상단계에 있는 많은 신약의 중간체로 사용될 뿐 아니라 수소화를 통해 (2S)-(2,3a β ,7a β)-옥타히드로인돌-2-카르복실산{(2S)-(2 α ,3a β ,7a β)-Octahydroindole-2-carboxylic acid}으로 전환할 경우 현재 서비어(Servier)사에서 판매중인 페린도프릴™ (Perindopril™)과 같은 고혈압 치료제의 중간체로 사용할 수 있기 때문에, 많은 연구가 진행되어 왔다.
- <3> 현재 광학활성을 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 그의 메틸 에스테르를 제조하는 방법은 1) 키랄 보조체(Chiral auxiliary)를 이용한 재결정 방법, 2) 키랄 보조체를 이용한 비대칭

수소화, 3) 키랄 보조체를 이용한 비대칭 환원을 통한 화학합성법, 4) 미생물 및 효소를 이용한 광학선택적 가수분해 방법 등 크게 4가지로 나눌 수 있다.

<4> 우선, 재결정 방법은 광학활성을 갖는 화합물을 보조물질로 사용하여 광학선택적으로 하나의 이성질체만을 얻으로 침전시켜 분리한다. 빈센트(Vincent) 등은 이의 예로서, (+)-알파-메틸벤질아민을 키랄 보조체로 사용하여 96%e.e.의 광학순도를 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산을 분리할 수 있었다(Vincent M. *et al.*, Tetrahedron Letters, 23(16), 1677, 1982).

<5> 또한 헨드릭스(Hendrickx) 등은 아세틸화된 인돌린-2-카르복실산과 함께(-)-(R,R)-4-(O₂N)C₆H₄CH(OH)CH(NH₂)CH₂OH 를 키랄 보조체로 사용하여 99%e.e.의 광학순도를 갖는 아세틸화된 (S)-인돌린-2-카르복실산을 분리할 수 있었다(Hendrickx A. J. J. & Kuilman T., EP 937,714(1999)). 그러나 재결정 공정은 키랄 보조체가 대부분 고가이며, 회수가 쉽지 않기 때문에 경제적인 공정을 개발하기 어려워 실제 산업에 응용되기 어려운 단점이 있다.

<6> 두 번째로 키랄 보조체를 이용한 비대칭 수소화는 기질과 키랄형의 리간드를 갖는 금속 촉매를 용매에 첨가한 뒤 기질을 광학 선택적으로 수소화하는 것이다. 구와노(Kuwano) 등은 탄산세슘이 들어있는 이소프로판올 용액하에서 아세틸화된 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르와 함께 촉매로서 [Rh(norbornadiene)₂]⁺SbF₆⁻, 리간드로서 Bis(diphenylphosphinoethyl)-biferrocene(S,S)-(R,R)-PhTRAP를 60℃, 5.0MPa의 조건으로 수소화하여 95%e.e.의 광학순도를 갖는 아세틸화된 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 95%의 수율로 획득하였다(Kuwano R. *et al.*, JACS, 122(31), 7614, 2000). 이 공정은 생성물의 수율이 높은 반면 광학순도가 낮은 단점이 있고, 수소화에 사용되는 키랄 보조체가 매우 고가이

며 합성이 간단하지 않을 뿐 아니라 고가의 장비 및 시설이 필요함에 따라 실제 공정에 적용하기에는 어려움이 많다.

<7> 세 번째로 키랄 보조체를 이용한 비대칭 환원을 통한 화학 합성법이 있는데, 이는 키랄 보조체를 이용하여 프로키랄형의 니트로페닐 피루브산을 광학 선택적으로 환원하여 알코올 유도체를 만들고 이를 중간체로 하여 광학활성형의 (S)-인돌린-2-카르복실산을 만드는 방법이다. 버즈비(Buzby) 등은 키랄 보조체로써 D-(+)-프롤린{D-(+)-Proline}을 사용하고 환원제로 수소화붕소나트륨(NaBH_4)을 이용하여 니트로페닐 피루브산을 광학 선택적으로 환원시켜 85%의 수율로 (S)-알파-하이드록시벤젠프로피온산을 합성하고 이를 염소화한 뒤, 니트로기를 아민기로 환원하면서 염기성 수용액 하에서 환상구조를 만들어 (S)-인돌린-2-카르복실산을 합성하였다(Buzby G.C. Jr et al., USP 4,614,806(1988)). 이들은 니트로페닐 피루브산으로부터 4 단계에 걸쳐 (S)-인돌린-2-카르복실산을 합성하였는데 많은 반응단계로 인하여 전체수율이 32% 이하로 매우 낮고 고가의 D-(+)-프롤린을 사용하는 점에서 경제적인 생산이 거의 불가능하다.

<8> 마지막 방법으로는, 미생물 및 효소를 이용한 광학선택적 가수분해 방법으로 2 가지가 보고되어 있다.

<9> 먼저 아사다(Asada) 등은 부탄올, 아밀알코올, 벤질알코올, 시클로헥산을, 시클로헥산디올, 글리세롤, 글리세롤-알파-모노클로로히드린, 에틸렌글리콜, 디클로로프로판올, 모노클로로히드린, 펜탄트리올 등과 같이 분자량이 큰 알코올과 라세믹 인돌린-2-카르복실산을 반응하여 에스테르 화합물을 만들고, 산업용 효소 및 미생물 균주로부터 정제한 효소를 이용하여 광학 선택적으로 분할하여 (S)형 또는 (R)형의 에스테르 화합물을 얻은 뒤 이를 가수분해하고 농축, 결정화, 침전 및 여과하여 높은 광학순도의 (S)형 또는 (R)형의 인돌린-2-카르복실산을 얻는 공정을 개발하였다(Asada et al., USP 4,898,822(1990)).

- 10> 그러나 아사다 등이 기질로 사용한 분자량이 큰 알코올로 이루어진 에스테르 화합물들은 컬럼에 충전된 소수성 수지(Hydrophobic resin)에 대한 흡착율(Adsorption ratio)을 높여 수율을 증가시킬 수 있는 반면, 동일한 양에서는 분자량이 작은 에스테르 화합물에 비해 단위 부피당 몰수가 감소하여 전체반응에서 수율이 낮아지므로 공정비용이 증가하게 된다.
- 11> 또한 아사다 등은 광학분할 공정에 산업용 효소와 미생물 균주로부터 정제한 효소를 이용하여 광학분할을 실시하였는데 이 중 산업용 효소는 스테아신(Steapsin)의 활성이 전반적으로 가장 높았고 정제효소는 아트로박터 니코티나(*Arthrobacter nicotiana*) 유래의 가수분해 효소의 활성이 가장 높았다.
- 12> 스테아신은 돼지 췌장으로부터 얻어진 리파제(Lipase)로 저렴한 효소이지만 전체 함량 중 25% 정도만이 단백질이며, 단백질내에 아밀라제(Amylase), 프로테아제(Protease)를 부가적으로 함유하고 있다. 이러한 이유로 부 반응이 발생하여 불순물이 생성되기 쉽고 또한 생성물의 분리 및 정제시 나머지 75%의 불순물과 전체 단백질 내의 불필요한 단백질로 인하여 에멀션 층을 형성하기 때문에 분리/정제 공정을 복잡하게 할 뿐 아니라 정제 수율도 감소된다.
- 13> 한편 미생물 균주 유래의 효소는 미생물의 배양조건에 따라 효소의 역가와 활성이 달라지고, 컬럼 크로마토그래피(Column chromatography)를 통한 정제과정과 같은 복잡한 과정이 필요하여 미생물 균주로부터 정제된 효소를 사용하여 반응을 시도할 경우 결과가 일정하지 않아 안정적인 생산이 어려운 단점이 있다.
- 14> 또한, 상기와 같이 효소반응으로 얻어진 (S)형 또는 (R)형의 에스테르 화합물들은 가수분해 후 농축, 결정화, 침전 및 여과와 같은 복잡한 공정을 통해서 높은 광학순도를 갖는 (S)형 또는 (R)형의 인돌린-2-카르복실산으로 전환되기 때문에, 전체 반응공정이 복잡할 뿐만 아니라 실질적인 전체 수율도 떨어져 경제성이 나빠지는 단점이 있다.

- 15> 한편 오레스테(Oreste) 등은 미생물 및 효소를 이용하여 아세틸화된 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 선택적으로 가수분해하여 광학활성을 갖는 아세틸화된 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르만을 제조하였다(Oreste G. et al., DE 3,727,411(1988)). 그러나 제조된 아세틸화 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 수율이 9%이고 광학순도도 최대 98%e.e.만을 갖기 때문에, 높은 광학활성을 갖고면서 높은 수율이 필요한 산업적인 생산 공정에 적용하기에는 어렵다는 단점이 있다. 또한 이들이 만든 생성물은 아세틸기를 제거해야 하기 때문에 키랄중심이 라세미화(racemization) 되기 쉬워 광학순도가 떨어질 수 있다는 단점이 있다.

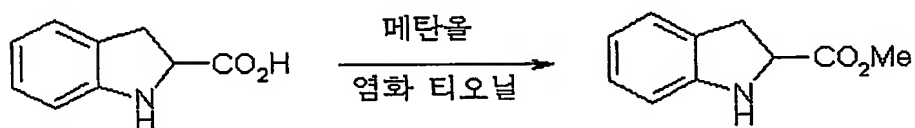
【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 16> 이에 상술한 문제를 해결하기 위하여 연구를 수행한 결과, 저 분자량의 알코올과 라세믹 인돌린-2-카르복실산을 이용하여 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 제조하고 산업용 가수분해 효소를 사용하여 광학분할시켜 높은 광학순도의 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 에스테르 화합물을 얻을 수 있었으며, 본 발명은 이를 기초로 완성되었다.
- 17> 따라서, 본 발명의 목적은 제조공정이 간단하여 경제적으로 효율이 높은 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 에스테르 화합물의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- 18> 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위한 가수분해 효소를 이용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 에스테르 화합물의 제조방법은 라세믹 인돌린-2-카르복실산과 메탄올 및 염화 티오닐을 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물을 얻는 단계; 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물을 가수분해 효소를 사용하여 가수분해 반응시켜 광학분할하는 단계; 및 상기 광학분할된 에스테르 화합물을 알칼리 수용액에서 가수분해 반응시켜 (S)-인돌린-2-카르복실산을 생성시키는 단계를 포함한다.

【발명의 구성 및 작용】

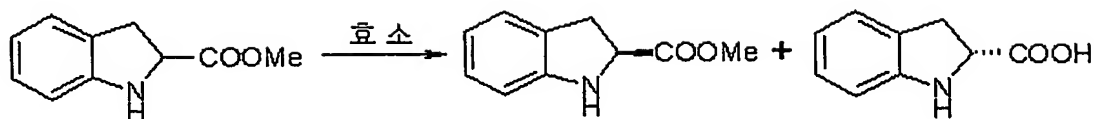
- 19> 이하, 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- 20> 전술한 바와 같이, 본 발명의 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 그의 메틸 에스테르의 제조방법은, 우선 메탄올과 염화티오닐을 라세믹 인돌린-2-카르복실산과 반응시킨다.
- 21> 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 제조하는 반응은 하기 반응식 1과 같다.

22> 【반응식 1】



- 23> 상기 반응식 1의 개시 물질인 라세믹 인돌린-2-카르복실산을 메탄올을 용매로 하여 용해시킨 뒤 염화 티오닐을 천천히 투입하면서 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 얻는다.
- 24> 이때, 상기 메탄올의 사용량은 라세믹 인돌린-2-카르복실산에 대해 1당량 내지 30당량이며, 염화 티오닐의 사용량은 1당량 내지 2당량이 바람직하다.
- 25> 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르는 하기 반응식 2와 같이 효소적 분할방법을 통해 광학 분해되는데, 상기 반응식 1에 의해 제조된 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 기질로 하여 100mM 탄산나트륨 완충용액에 적절히 용해 및 분산시킨 후, 가수분해 효소를 첨가하여 교반시키면 (R)-이성질체만을 선택적으로 가수분해 시킴으로써 광학활성을 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르가 생성된다.

26> 【반응식 2】



27> 본 발명에서는 효소의 기질로 분자량이 큰 알코올로 이루어진 에스테르 화합물보다 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르와 같이 분자량이 적은 에스테르 화합물을 사용하게 되므로 동일량에서 단위부피 당 몰 수가 증가하여 경제적인 생산공정의 개발이 가능하게 된다. 또한 미생물 균주로부터 정제한 효소보다는 안정적인 역가와 뛰어난 활성을 보이는 산업용 효소를 촉매로 활용하기 위해서는, 기존에 알려진 산업용 효소들에 비해 저렴하면서도 활성이 뛰어난 산업용 효소의 확보가 실제적 생산공정에 필수적이므로 저가의 효소 확보를 최우선으로 하였다.

28> 따라서, 본 발명에서는 미생물이나 포유류 기원의 상업적으로 판매되어지는 가수분해 효소들을 이용하여 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 가수분해를 시도하였는데 그 결과, 하기 7 종의 효소가 광학선택적으로 (R)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르만을 가수분해하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르만 남기는 것을 확인하였다. 이러한 활성을 갖는 산업용 효소로는 프로테아제(Protease)류와 아실라제(Acylase)가 있다.

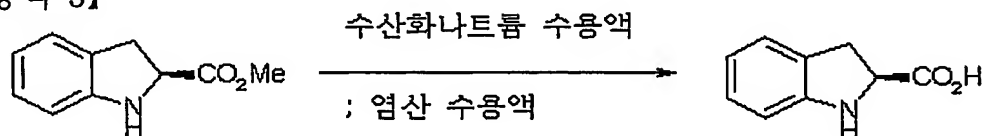
29> 프로테아제는 사비나제[Savinase, 바실러스(*Bacillus*) 유래의 노보(Novo)사 제품], 알칼라제[Alcalase, 바실러스 리첸포르미스(*Bacillus lichenformis*) 유래의 노보사 제품], 노보짐 243[Novozym 243, 바실러스 리첸포르미스 유래의 노보사 제품], 에버라제[Everase, 바실러스 유래의 노보사 제품], 에스퍼라제[Esperase, 바실러스 유래의 노보사 제품], 프로테아제

7[Protease 7, 아스퍼질러스 오리자(*Aspergillus oryzae*) 유래의 유로파(Europa)사 제품]이 있고 아실라제는 페니실리움(*Penicillium*) 유래의 아실라제(유로파사 제품)가 있다.

- 30> 상기 7종류의 효소 중 특히 좋은 활성을 보이는 효소는 사비나제로 짧은 시간 동안에 라세딕 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 선택적으로 가수분해하여 높은 수율과 높은 광학순도를 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 생성할 수 있고, 또한 효소의 가격이 매우 저렴하여 실제적인 공정에 최고로 적합하다.
- 31> 사비나제는 세린기를 갖는 프로테아제인 서브틸리진(Subtilisin, EC 3.4.21.62)으로 유전자 변형된 호염기성 바실러스 속(*Alkalophilic Bacillus* sp.)의 발효를 통해 생산되는 데 이 효소는 세제산업에서 대량으로 이용될 만큼 매우 저렴하다(Mahmoudian M. et al., *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 1201, 1999). 또한 이 효소는 수용액상으로 판매되기 때문에 가수분해 반응을 할 경우 반응기로의 직접 사용이 가능한 장점을 갖고 있다. 아울러 상기 효소는 분말이나 액상형태, 또는 담체로 고정화된 형태를 모두 포함할 수 있다.
- 32> 본 발명에 있어서, 상기 효소 반응시의 pH는 pH 7~9의 범위가 적절하며, pH 7 미만이면 반응속도가 느려지고 pH 9를 초과하면 수율이 떨어지는 문제점이 있다. 또한, 효소 반응온도는 25~50℃가 바람직하며, 상기 온도가 25℃ 미만이면 반응속도가 너무 느려지는 단점이 있고, 반응온도가 50℃를 초과하면 광학순도가 떨어지는 문제점이 있다.
- 33> 한편, 상기 효소와 기질의 비율은 무게비로 1 : 10 ~ 1 : 40이 바람직하며, 상기 범위를 벗어날 경우 효소의 양이 너무 많아 경제성이 떨어지거나 반응속도가 너무 느려지는 문제점이 있다. 이때 기질의 농도는 10 ~ 50%(w/v)인 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어날 경우 전체부피에 비해 기질의 양이 너무 적어 경제성이 맞지 않고, 반대로 너무 많은 경우 반응속도가 느려지고 수율이 감소하는 단점이 있다. 또한, 반응 시간은 3 ~ 85시간이 바람직하다.

- 34> 마지막 단계로, 광학활성을 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르로부터 광학활성을 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산을 제조하는 가수분해반응은 하기 반응식 3과 같다.

35> 【반응식 3】



- 36> 반응식 2에 의해 제조된 광학활성을 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르를 수산화나트륨 수용액과 상온에서 가수분해 반응시키고, 다시 염산 수용액으로 산성화하여 pH 5로 조절한 후, 유기용매로 추출하여 광학활성을 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산을 제조한다.
- 37> 이렇게 제조된 (S)-인돌린-2-카르복실산은 99%e.e. 이상의 높은 광학순도를 나타낸다.
- 38> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명하지만 하기 예에 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

39> 실시예 1

40> 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 제조

- 41> 적하 깔때기(Dropping funnel)가 설치된 500ml 반응기에 인돌-2-카르복실산 (Indole-2-carboxylic acid) 25g과 메탄올 130ml를 투입하고, 적하 깔때기에는 염화 티오닐 11.2ml를 투입한다. 적하 깔때기를 통하여 염화 티오닐을 천천히 투입한 뒤 투입이 완료되면 온도를 올려 60℃에서 2시간 동안 추가로 교반하고 감압증류를 통해 염화 티오닐과 메탄올을 제거한다. 에틸 초산(Ethyl acetate) 130ml를 투입하고, 중조(NaHCO₃) 포화수용액 100ml를 천천히 투입하면서 교반한 뒤 정지한다. 분별깔때기를 이용하여 에틸 초산 130ml로 2회 추출하고, 유기층을 500ml 둥근바닥 플라스크에 담는다. 감압증류하여 용매를 제거하여 라세믹

인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 26.6g을 얻었다. 반응생성물이 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르임을 핵자기공명 분석법으로 확인하였다.

42> ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 3.38 (dd, 2 H), 3.77 (s, 3 H), 4.40 (dd, 1 H), 6.76 (t, 2 H), 7.07 (t, 2 H)

43> 실시예 2

44> 산업용 가수분해 효소를 이용한 라세믹 에스테르의 분할

45> 100mM 탄산 완충용액(pH8.0) 80ml에 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 20g을 넣고 pH 8.0으로 조정 한 다음 산업용 효소의 하나인 사비나제(노보사) 1g을 정량하여 첨가한 뒤 35℃에서 반응을 수행하였다. 반응중의 pH는 5노르말 수산화나트륨 용액을 이용하여 7.8 ~ 8.2로 유지시켰다. 반응 후 일정시간마다 반응액 0.1ml을 취해 0.1ml의 포화 중조 수용액과 잘 섞은 다음 0.5ml의 에틸 초산으로 반응물을 추출해 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

46> 가스 크로마토그래피 분석조건은 다음과 같다. 분석조건으로 실리카를 충전시킨 캐필러리 컬럼(Beta-DEX 120, 30m \times 0.25mm \times 0.25m, Supelco사 제품)을 160℃에서 1분 정치시킨 뒤, 분당 1℃씩 180℃까지 승온하고 다시 5분동안 정치시킨다. 캐리어 가스로는 헬륨가스를 분당 1ml의 속도로 흘리고 250℃에서 불꽃 이온화 검출기(Flame Ionization Detector, FID)를 사용하여 검출한다. (R)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르는 17.0 분, (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르는 17.4 분에서 검출되기 때문에 두 이성질체를 쉽게 구별할 수 있다.

47> 분석결과는 수율[%]과 광학순도[%e.e.]로 나타내었으며 (S)-에스테르의 수율은 하기 수
학식 1을 사용하여 계산하였고, (S)-에스테르의 광학순도는 하기 수학식 2를 사용하여 계산하
였다.

48>

$$\text{수율}[\%] = \frac{\text{반응후 남은 (S)-에스테르 화합물의 질량}[\text{g}]}{\text{반응전의 라세믹 에스테르 화합물의 질량}[\text{g}]} \times 100$$

【수학식 1】

49>

$$\text{광학순도}[\%e.e.] = \frac{\text{(S)-에스테르} - \text{(R)-에스테르}}{\text{(S)-에스테르} + \text{(R)-에스테르}} \times 100$$

【수학식 2】

50> 상기 조건으로 반응시간에 따른 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도
[%e.e.]를 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

51> 【표 1】

반응시간에 따른 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도 [%e.e.]

반응시간 (시간)	광학순도 (%e.e.)
1	62.7
2	87.0
3	95.5
4	97.9
5	99.3

52> 5시간 반응 후 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도가 99%e.e. 이상이 되
면 반응을 중지하고 분별깔때기로 옮긴 뒤, 에틸 초산 80ml로 3회 추출하고, 유기 용매층을 따
로 분리하여 감압증류로 용매를 제거한 결과 9.38g의 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르
를 회수하였고 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 이때 (S)-인돌린-2-카르복실산 메
틸 에스테르의 수율은 47.0%이고 광학순도는 99.3%e.e.이다.

53> 실시예 3

54> 가수분해를 통한 (S)-인돌린-2-카르복실산의 제조

55> pH 미터가 부착된 250ml 반응기에 실시예 2에서 제조한 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 8.1g과 1 노르말 수산화나트륨 수용액 50ml를 넣고 상온에서 강하게 교반하였다. (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르가 (S)-인돌린-2-카르복실산으로 전환된 것을 확인한 후, 반응기 온도를 20℃ 이하로 유지하면서 1 노르말 염산 수용액을 천천히 투입하여 pH 5가 되도록 하였다. 분별깔때기를 이용하여 에틸 초산 50ml로 3회 추출하고, 유기층을 둥근바닥 플라스크에 담았다. 감압증류를 통하여 용매를 제거하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 7.0g을 얻었다. 이와 같이 제조된 (S)-인돌린-2-카르복실산의 광학순도는 액체 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

56> 액체 크로마토그래피의 분석조건은 다음과 같다.

57> 컬럼으로는 아틸로스 유도체로 이루어진 키랄팩 에이디(Chiralpak AD, Daicel사)를 사용하였고, 용리액으로는 헥산, 이소프로판올 및 트리플루오르아세트산을 95:5:0.1의 비율로 사용하여 분당 1ml의 속도로 흘려주었으며, 반응생성물은 UV 220nm에서 검출하였다. 상기 반응의 반응물인 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르는 11.9분, (R)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르는 12.4분, 가수분해 생성물인 (S)-인돌린-2-카르복실산은 23.8분, (R)-인돌린-2-카르복실산은 32.0분에서 검출되었다.

58> 분석결과는 수율[%]과 광학순도[%e.e.]로 나타내었으며 (S)-에스테르의 수율은 하기 수학적식 3을 사용하여 계산하였고, (S)-에스테르의 광학순도는 수학적식 2를 사용하여 계산하였다.

59>

$$\text{수율}[\%] = \frac{\text{반응후 남은 (S)-카르복실산의 몰수}[\text{mol}]}{\text{반응전의 (S)-에스테르 화합물의 몰수}[\text{mol}]} \times 100$$

【수학식 3】

60>

상기 조건으로 측정하여 얻은 가수분해로 생성된 (S)-인돌린-2-카르복실산의 수율[%]은 94.5%이고, 광학순도[%e.e.]는 99.3%e.e.이다.

61>

실시예 4~10

62>

실시예 2의 조건 중 기질 및 효소의 양, 반응온도, 완충용액의 부피는 실시예 2와 동일한 조건하에서 유지시키고 완충용액의 pH를 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0 으로 다양하게 변화시킨 뒤 완충용액을 첨가하여 반응을 수행하면서 매시간마다 분석하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도가 99%e.e. 정도 되었을 때 반응을 중지하고 실시예 2와 같은 방법으로 회수하고 분석한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

63> 【표 2】

완충용액의 pH 변화에 따른 소요시간 및 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 수율[%] 및 광학순도[%e.e.]

실시예	완충용액의 pH	소요시간(시간)	수율[%]	광학순도[%e.e.]
4	6.5	80	55.0	96.2
5	7.0	33	48.2	99.1
6	7.5	11	47.3	99.5
7	8.0	5	47.0	99.3
8	8.5	3	45.6	99.0
9	9.0	2	43.6	98.9
10	10.0	2	6.3	98.8

64>

실시예 11~17

65>

실시예 2의 조건 중 기질 및 효소의 양, 완충용액의 pH 및 부피는 실시예 2와 동일한 조건으로 유지시키고 반응온도를 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60℃로 다양하게 변화시킨 뒤 반응을 수행하면서 매시간마다 분석하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도가

99%e.e. 정도 되었을 때 반응을 중지하고 실시예 2와 같은 방법으로 회수하고 분석한 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

66> 【표 3】

반응온도(℃)에 따른 소요시간 및 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 수율[%] 및 광학순도[%e.e.]

실시예	온도(℃)	소요시간(시간)	수율[%]	광학순도[%e.e.]
11	25	7	46.9	99.2
12	30	7	46.6	99.4
13	35	5	47.0	99.3
14	40	4	46.8	99.0
15	45	4	44.5	99.5
16	50	3	44.7	99.1
17	60	5	55.1	77.8

67> 실시예 18~22

68> 실시예 2의 조건 중 완충용액의 pH 및 부피, 반응온도는 실시예 2와 동일한 조건하에서 유지시키고 기질/효소비를 20으로 유지하면서 기질량을 10, 20, 30, 40, 50g으로 다양하게 변화시킨 뒤 반응을 수행하면서 매시간마다 분석하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도가 99%e.e. 정도 되었을 때 반응을 중지하고 실시예 2와 같은 방법으로 회수하고 분석한 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

69> 【표 4】

기질량(g) 변화에 따른 소요시간 및 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 수율[%] 및 광학순도[%e.e.]

실시예	기질량(g)	효소량(g)	소요시간	수율[%]	광학순도[%e.e.]
18	10	0.5	3	44.0	99.5
19	20	1	5	47.0	99.3
20	30	1.5	9	47.1	99.0
21	40	2	14	49.1	99.3
22	50	2.5	44	27.6	98.9

70> 실시예 23~26

71> 실시예 2의 조건 중 기질량, 완충용액의 pH 및 부피, 반응온도는 실시예 2와 동일한 조건하에서 유지시키고 기질/효소 비율을 10, 20, 30, 40으로 다양하게 변화시킨 뒤 반응을 수행

하면서 매시간마다 분석하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도가 99%e.e. 정도 되었을 때 반응을 중지하고 실시예 2와 같은 방법으로 회수하고 분석한 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

72> 【표 5】

기질/효소 비율의 변화에 따른 소요시간 및 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 수율[%] 및 광학순도 [%e.e.]

실시예	기질/효소 비율	효소양(g)	소요시간(시간)	수율[%]	광학순도[%e.e.]
23	10	2	3	44.0	99.7
24	20	1	5	47.0	99.3
25	30	0.67	7	44.7	99.0
26	40	0.5	9	43.6	99.6

73> 실시예27~33

74> 실시예 2의 조건 중 완충용액의 pH 및 부피, 기질양, 반응온도는 실시예 2와 동일하게 유지하고, 효소의 양을 4g으로 변화시키고 산업용 효소의 종류를 사비나제, 알카라제, 노보짐 243, 에버라제, 에스퍼라제, 프로테아제 7, 아실라제 등으로 변화시킨 뒤 반응을 수행하면서 매시간마다 분석하여 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 광학순도가 99%e.e. 정도 되었을 때 반응을 중지하고 실시예 2와 같은 방법으로 회수하고 분석한 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

75> 【표 6】

효소의 종류의 변화에 따른 소요시간 및 (S)-인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르의 수율[%] 및 광학순도[%e.e.]

실시예	효소명	소요시간(시간)	수율[%]	광학순도[%e.e.]
27	사비나제	1	43.8	99.5
28	알카라제	2	31.4	99.6
29	노보짐 243	3	36.8	99.7
30	에버라제	3	42.9	99.5
31	에스퍼라제	5	40.2	99.3
32	프로테아제 7	7	35.5	98.5
33	아실라제	9	30.2	99.0

【발명의 효과】

- 76> 상기 실시예를 통해 알 수 있듯이, 본 발명에 따른 방법은 상업적으로 이용가능한 가수분해 효소를 사용하여 광학순도 99%e.e. 이상의 매우 높은 광학순도를 갖는 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 에스테르 화합물을 단순화된 생산 공정을 통해 경제적으로 제조할 수 있는 실제적인 생산이 가능한 공정을 제공한다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

라세믹 인돌린-2-카르복실산과 메탄올 및 염화 티오닐을 반응시켜 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물을 얻는 단계; 상기 라세믹 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물을 가수분해 효소를 사용하여 가수분해 반응시켜 광학분할하는 단계; 및

상기 광학분할된 에스테르 화합물을 알칼리 수용액에서 가수분해 반응시켜 (S)-인돌린-2-카르복실산을 생성시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 가수분해 효소를 사용한 (S)-인돌린-2-카르복실산 및 이의 메틸 에스테르 화합물의 제조방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 가수분해 효소는 사비나제(Savinase), 알카라제(Alcalase), 노보 짐 243(Novozym 243), 에버라제(Everlase), 에스퍼라제(Espersase), 프로테아제 7(Protease 7), 또는 아실라제(Acylase)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 완충용액은 탄산나트륨 완충용액이며, pH를 7 내지 9로 유지시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 광학 분할 단계는 25 내지 50℃에서 3 ~ 85시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 가수분해 효소에 대한 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물의 비율은 무게비로 1 : 10 내지 40인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 가수분해 효소와 반응하는 인돌린-2-카르복실산 메틸 에스테르 화합물의 농도는 10 내지 50%(w/w)인 것을 특징으로 하는 방법.



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002806

International filing date: 03 November 2004 (03.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0084492
Filing date: 26 November 2003 (26.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 26 November 2004 (26.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse